

a III
—

Über das Hämoglobin des Breitmaulnashorns und die Evolution der Perissodactylen

Hans-Peter Kley
—

1972
—

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
Direktor: Professor Dr. A. Butenandt

Über das Hämoglobin des Breitmaul-
nashorns und die Evolution der
Perissodactylen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Hans-Peter Kley
aus
München
1972



1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Braunitzer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

Tag der mündl. Prüfung: 25.II. 1972

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer im Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Butenandt danke ich für die großzügige Förderung meiner Arbeit und Herrn Prof. Dr. G. Braunitzer für seine vielen Anregungen und Rat-schläge.

Für die Beschaffung von Frischblut danke ich folgenden Herren,

Direktor L. Heck vom Tierpark Hellabrunn in München (Zebrablut)

Dr. R. C. Bigalke vom Natal Parks, Game und Fish Preservation Board aus Pietermaritzburg in Südafrika (Nashornblut)

Prof. Dr. H.G. Klös vom Berliner Zoo (Tapirblut)

Dank schulde ich:

- Herrn A. Stangl für die wertvolle Unterstützung bei der Trennung und Reinigung der Peptide,
- Frl. H. Kummer und Frl. J. Pickl für die gewissenhafte Durchführung der Analysen,
- Herrn Dr. med. H. Conrad und Herrn Dr. med. F. Krug für die Überlassung von unpublizierten Ergebnissen.

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

AEC	S-Aminoethylcystein
Bis	N' N' -Methylbisacrylamid
Dansyl	1,5 -Dimethylamino-naphtalin-sulfonyl
DCA	Dichloressigsäure
CM	Carboxymethyl
DEAE	Diaminoethyl-aminoethyl
PC	Phosphorcellulose
α T-1	tryptisches Peptid Nr. 1 der α -Ketten
TEMED	N' N' -tetramethyläthylendiamin
TPCK	L-(1-Tosylamino-2-phenyl)-äthyl-chlor-methylketon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Rh	Nashorn
5-Rh-II	II. Gipfel aus dem Sephadexlauf der Nashorn β -Kette
Esel	Equus africanus forma asinus
Zebra	Equus zebra hartmannae
Rhinozerus	Ceratotherium simum simum
Tapir	Tapirus terrestris L.
Hb-A	Hauptkomponente von Humanhämoglobin

<u>Einleitung</u>	1
<u>Allgemeiner Teil</u>	
Hämoglobine von Zebra, Nashorn und Tapir	4
Elektrophorese und Säulenchromatographie	6
Die Bruttoformel von Nashornhämoglobin	8
Kettentrennung (Gegenstromverteilung)	8
Fingerprints	13
Lösliche tryptische Peptide	14
Spaltung	14
Chromatographie über Gele und Ionenaustauscher	15
Die Aufarbeitung der Fraktion 5-Rh-II	17
Bruttoformel tryptischer Peptide (α -Ketten)	19
Bruttoformel tryptischer Peptide (β -Ketten)	23
Vergleich der homologen tryptischen Peptide	29
von Nashorn- und Pferdeglobin	
Austausche zwischen Nashorn- und Humanglobin	35
<u>Diskussion der Ergebnisse</u>	36
<u>Experimenteller Teil</u>	43
<u>Zusammenfassung</u>	53
<u>Literaturverzeichnis</u>	54

E i n l e i t u n g

Die biochemische Forschung der letzten zwei Jahrzehnte hat es möglich gemacht, die stofflichen Träger des Lebens, die Proteine und die Nukleinsäuren, im Reagenzglas zu analysieren und viele Eigenschaften der belebten Materie aus molekular-biologischer Sicht kausal zu erklären. (1-3)

Entsprechend dieser Entwicklung kann man die Frage nach dem Entstehen der Arten im Laufe der Erdgeschichte neu formulieren: Wie verändern sich biologische Moleküle in der Zeit? Wie ähnlich sind die gleichen Moleküle bei verwandten Arten?

Von den Makromolekülen eignen sich Eiweißstoffe besonders gut für die vergleichende Untersuchung, da ihre Struktur genetisch determiniert ist. Die Analyse der Proteine gibt uns dadurch einen Einblick in genetische Mechanismen bei Tieren und Pflanzen.

Viele Arbeitsgruppen befassen sich mit der biochemischen Evolution von Eiweißstoffen, aber nur wenige Moleküle weisen für diese Untersuchungen die gleichen Vorteile auf wie das Hämoglobin.

Zwar wurden Fibronopeptide, Cytochrom c, Ferredoxin, Lysozym (5) und andere auch im Hinblick auf ihre Phylogenie untersucht, aber sie haben gegenüber Hämoglobin einen entscheidenden Nachteil: Sie bestehen jeweils nur aus einer Polypeptidkette. Das Hämoglobin ist dagegen tetramer und besteht aus zwei Kettentypen. Beim Hb des adulten Wirbeltieres liegen die Ketten paarweise vor, und man bezeichnet sie mit α und β . Daneben produzieren die meisten Wirbeltiere noch eine ganze Anzahl anderer Hämoglobinkomponenten, wie embryonale (6) und fötale (7) Hämoglobine. Die Ähnlichkeit, die sich in der chemischen Konstitution dieser Ketten feststellen läßt, könnte man so erklären, daß zuerst ein gemeinsames Gen vor-

handen war und später Genduplikationen stattfanden. Eine darauffolgende Eigenentwicklung und Veränderung der Gene führt dann auch zu einer Änderung in den Eigenschaften der Genprodukte. Es wird dadurch möglich, einen Organismus in verschiedenen Stadien seiner Individualentwicklung an eine wechselnde Umwelt anzupassen.

Man fand, daß das Hb von Mensch und Gorilla sehr ähnlich ist, das Hb des Pferdes dagegen an vielen Stellen Sequenzunterschiede aufweist. Es wurde vorgeschlagen, daß Aminosäuresequenzen von homologen Proteinen die Grundlage für quantitative phylogenetische Stammbäume bilden könnten. (8)

PAULING und ZUCKERKANDL (8) haben festgestellt, daß die Austauschrate der Aminosäuren bei verschiedenen Säugetierhämoblobinen überraschend konstant ist. Sie liegt bei sieben Millionen Jahren für eine ausgetauschte Aminosäure. Diese Zahl ist allerdings noch mit statistischen Fehlern behaftet. Beim Hämoglobin des Karpfens (9) und des Flußneunauges, (10) als Vertreter niedriger Wirbeltiere, fand man später diese Werte bestätigt. Die vorliegende Arbeit berichtet über die Hämoblobine von drei Unpaarhufern (Perissodactylen) dem Hb des Bergzebras (*Equus quagga hartmannae*), dem des Breitmaulnashorns (*Ceratotherium simum*), dem des südamerikanischen Tapirs (*Tapirus terrestris*). Die genannten Tiere sind mehr oder weniger mit dem Hauspferd verwandt, dessen Globinketten schon sequenziert sind (11-13).

Das Globin des Nashorns wurde genauer untersucht. Die tryptischen Peptide der α - und β -Ketten isoliert und mit dem Globin des Pferdes verglichen. Anhand der Anzahl der gefundenen Aminosäuresubstitutionen ist es möglich abzuschätzen, zu welcher Zeit sich die Entwicklung von Pferd und Nashorn getrennt hat. Diese Abschätzung stimmt mit den paläontologischen Daten überein. Die molekularen und phylogenetischen Aspekte dieser Befunde werden diskutiert und

dienen dazu, unsere Kenntnisse von der Evolution der Perissodactylen auf molekularer Basis zu erweitern.

Allgemeiner Teil

Das Hämoglobin des Nashorns, des Zebras und des Tapirs.

Der Aufklärung der Primärstruktur von Humanhämoglobin-A folgte (14+15) bald die Röntgenstrukturanalyse von Pferdehämoglobin in 5,5 Å Auflösung. Um die Befunde richtig deuten zu können, war es notwendig von letzterem Eiweißstoff die Reihenfolge der Aminosäuren mit chemischen Methoden zu untersuchen.

Die α -Ketten wurden von G. BRAUNITZER, G. MATSUDA und R. GEHRING, die β -Ketten von D.B. SMITH in Kanada bearbeitet. (11-13) Das Globin des Pferdes besteht aus zwei Komponenten mit verschiedener elektrophoretischer Beweglichkeit. (17) In ihnen liegen zwei verschiedene α -Ketten vor, die mit denselben β -Ketten gepaart sind. Außerdem gibt es eine Variabilität in den α -Ketten in Position 24. (18)

Beide Befunde konnten beim naheverwandten Esel (*Equus africanus forma asinus*) und dem Hartm. Bergzebra (*Equus quagga hartmannae*) (19) nicht erhalten werden.

Aus morphologischen Daten wissen wir (40), daß die hier untersuchte Zebraart dem Esel näher steht als dem Hauspferd (*Equus africanus forma caballus*).

Diese Ähnlichkeit konnte CONRAD (20) aufgrund von Hämoglobinuntersuchungen am Esel schlüssig zeigen.

Auch das afrikanische Breitmaulnashorn (*Ceratotherium simum*) zeigt in der Elektrophorese nur eine Hämoglobinkomponente. Das Nashorn gehört seiner systematischen Stellung nach nicht zur Familie der Equiden, sondern bildet mit anderen Nashörnern aus Asien und Afrika eine eigene Familie in der Ordnung der Unpaarhufer oder Perissodactylen (s.h. Abb.: 1). Der Tapir (*Tapirus terrestris*) ist der dritte Seitenzweig der Perissodactylen, der sich vor vielen Millionen Jahren von den übrigen Familien

abgetrennt hat. Er wirkt auf uns heute wie ein lebendiges Fossil aus dem Tertiär. Alle drei Arten sind der kleine Überrest einer großen Formenvielfalt aus früheren erdgeschichtlichen Zeiten.

Vor jeder Strukturaufklärung eines Eiweißstoffes muß die Einheitlichkeit des Ausgangsmaterials gesichert sein. Das bedeutet in unserem Fall, es muß festgestellt werden, aus wieviel Untereinheiten das zu untersuchende Hb besteht und ob Nebenbanden nachweisbar sind.

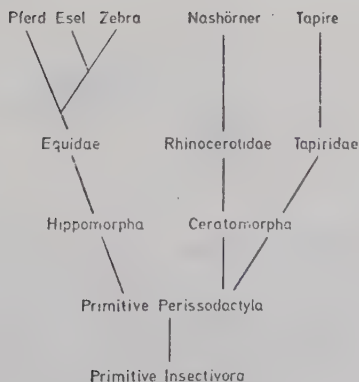


Abb.: 1 Die phylogenetischen Beziehungen zwischen Pferd, Esel, Zebra, Nashorn und Tapir. (aus 38)

Elektrophorese und Säulenchromatographie

Durch Polyacrylamidgelelektrophorese (22,23) wurde die Laufgeschwindigkeit des Nashorn-Hb mit dem Hb anderer Unpaarhufer und dem des Menschen verglichen.

Beim Nashorn-Hb ist wie beim Hb des Esels und des Zebras nur eine Komponente nachweisbar. Der Rf-Wert beträgt in der Elektrophorese 0,41 gegenüber dem von Hb-A im selben System von 0,34. Das Hb des Tapirs besteht aus 3 mengenmäßig ungleichen Komponenten (siehe Abb.:2).

Der Rf-Wert beträgt 0,41-0,46. Die langsamste Fraktion entspricht in ihrer Laufgeschwindigkeit damit der des Nashorns.

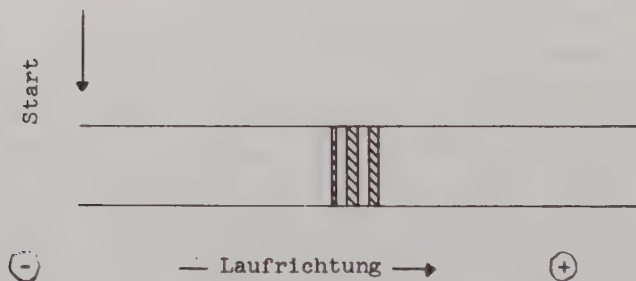


Abb.: 2 Diskelektrophorese von Tapir-Hb.

10% Gel, Glycinpuffer pH 8,3 , 4 mA pro Röhrchen

Es gelang nicht durch Säulenchromatographie an Cellulose-Austauschern (24) unter den gegebenen Versuchsbedingungen, eine Auftrennung in mehrere Banden zu erreichen. Ebenso wurde beim Zebra-Hb eine Trennung über DEAE- und CM- Cellulose durchgeführt. Auch dieses Protein konnte nur in einem Gipfel eluiert werden (s. Abb.: 3).

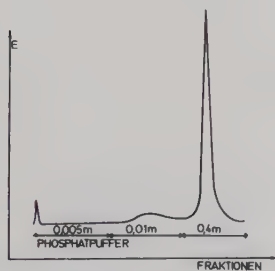


Abb.: 3 DEAE-Cellulose Chromatographie von Zebra-Hb.

Säule: 10 x 1 cm, Phosphatpuffer pH 8,6,

Äquilibrierpuffer 0,005m,

1. Gradient 0,01m

2. Gradient 0,4m

Die Bruttoformel von Nashorn-Hämoglobin

Zur Feststellung der einzelnen Molanteile der Aminosäuren im Protein wurde Hb vom Nashorn und Zebra mit verschiedener Zeitdauer hydrolysiert, und nach SPACKMAN, STEIN und MOORE (25) mit einem Analysator der Fa. Beckman (Spinco Div.) die Bruttozusammensetzung bestimmt.

In der Tabelle 1 werden die gefundenen Werte von Nashorn- und Zebra-Hb mit Hämoglobin anderer Säugetierordnungen verglichen. Weitgehende Übereinstimmung findet man, wenn man die Werte des Zebras mit denen des Esels vergleicht. Dabei ist zu beachten, daß bei den Analysenwerten der Unpaarhufer das Pferd, das Zebra und der Esel der gleichen Gattung angehören und dagegen das Nashorn einer anderen Familie zu zuordnen ist.

Die Gruppe der Perissodactylen unterscheidet sich deutlich von der Gruppe der Primates, Artiodactyla und Rodentia.

Für die weiteren Untersuchungen ist es notwendig die prosthetische Gruppe, das Häm, zu entfernen und mit reinem Apoprotein (Globin) weiterzuarbeiten. (s. experimentellen Teil)

Bei der Isolierung der einzelnen trypt. Peptide wurde von getrennten Ketten ausgegangen. Die Vortrennung des Globins in α - und β -Ketten ist sinnvoll, weil die Ketten in weiten Bereichen ähnlich sind und außerdem nicht jedesmal von neuem entschieden werden muß, welcher der beiden Ketten das Peptid zugehörig ist.

Kettentrennung (Gegenstromverteilung)

Ein System zur Trennung der Globinketten wurde von HILL und CRAIG (27) ausgearbeitet. Es beruht auf einem verschiedenem Verteilungsverhalten der beiden Ketten in einem

binären System von Dichloressigsäure und sek. Butanol. In einer Gegenstromverteilung von 80 Verteilungsschritten gelang HILL und CRAIG eine gute Trennung der α - und β -Ketten von Humanglobin.

Dieses System wurde in modifizierter Form angewendet, um eine höhere Kapazität zu erreichen. Es wurde die Konzentration der Dichloressigsäure geändert. Die Ketten des Nashorn-Globin wurden in 3 Läufen mit 170, 440 und 600 Schritten getrennt. In Abb. 4 ist ein Verteilungsdiagramm dargestellt. Die Ausbeuten betrugen 60-80% des eingesetzten Materials und verminderten sich bei längerer Dialyse erheblich (2-3 Tage).

Die isolierten Ketten wurden hydrolysiert und die Bruttoformel bestimmt (s. Tabelle 2)

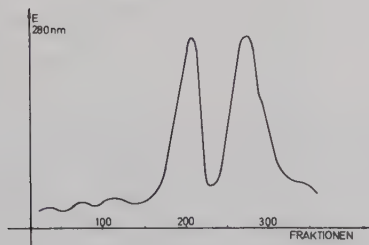


Abb.: 4 Gegenstromverteilungsdiagramm von Nashorn-Globin
Versuchsbedingungen: Oberphase sek. Butanol
Unterphase 8% DCA und 0,5 n
Essigsäure im Verhältnis 9:1:11
Absorption bei 280 nm der vereinigten Ober- und
Unterphasen, eingesetzte Menge 1500 mg, 600 Schritte.

Tab.: 1 Bruttoformel von Hämoglobinen
verschiedener Säugetierordnungen

Amino- säuren	Prima- tes * Mensch	Roden- tia * Maus	Perissodactyla				Artio- dactyla Rind *
			Pferd *	Esel *	Zebra	Nashorn	
Lys	44	44	44	44	46,1	44,5	44
His	38	40	38	36	38,7	38,1	34
Arg	12	12	14	14	15,0	12,8	14
Asx	50	54	54	56	55,8	49,5	56
Thr	32	24	24	26	25,9	31,9	28
Ser	32	42	38	36	36,3	30,0	38
Glx	32	26	36	38	39,0	42,6	34
Pro	28	18	22	22	22,8	22,7	20
Gly	40	50	48	46	46,4	42,4	38
Ala	72	80	62	60	59,1	66,0	72
Cys	6	4	4	4	4,0	4	2
Val	62	48	58	60	52,4	57,0	60
Met	6	6	4	4	4,1	4,0	8
Ile	-	12	-	-	-	-	-
Leu	72	68	80	80	80,3	79,1	74
Tyr	12	12	12	10	9,6	13,7	10
Phe	30	28	30	32	32,2	29,3	34
Trp	6	6	6	6	6,0	6	6
Summe	574	574	574	574	573,7	573,9	574

* Aus der Sequenz berechnet

Tab.: 2 Bruttoformel der α - und β -Ketten von Nashorn und Zebra verglichen mit Esel⁺ und Pferd⁺⁺

⁺H. Conrad Diss. Universität München

⁺⁺M.O. Dayhoff Atlas of Protein Sequence and Structure (1968)

	α - Ketten				β - Ketten			
	Nashorn	Zebra	Esel	Pferd	Nashorn	Zebra	Esel	Pferd
Lys	10,0	11,0	11,0	11	13,0	11,9	11,1	11
His	9,5	9,1	9,0	10	9,4	9,6	9,2	9
Arg	3,0	3,2	3,2	3	2,9	4,3	4,0	4
Asx	12,0	14,0	14,0	13	12,7	14,2	14,7	14
Thr	10,3	8,9	9,1	9	5,5	3,7	3,9	3
Ser	10,3	10,7	11,2	13	4,7	6,5	6,8	6
Glx	7,6	6,1	4,8	4	12,8	14,4	14,0	14
Pro	7,5	6,1	5,6	6	4,7	4,9	5,5	5
Gly	8,7	10,6	10,4	10	11,4	12,9	12,5	14
Ala	14,5	15,5	15,8	16	16,7	13,6	13,8	15
Val	11,7	12,1	12,6	12	17,3	15,3	16,0	17
Met	0,9	1,1	0,9	1	1,0	1,1	0,9	1
Leu	20,9	20,3	21,0	21	19,6	19,3	19,5	19
Tyr	3,8	2,2	1,9	3	3,0	3,0	2,9	3
Phe	7,2	8,1	7,9	7	8,0	8,2	8,5	8
Cys	1	1	1,0	1	1	1	1	1
Trp	1	1	1	1	2	2	2	2

^o aus der Sequenz berechnet

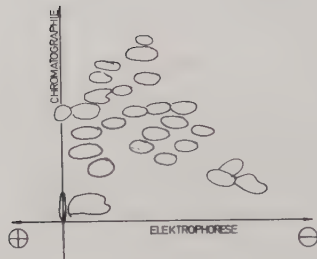


Abb.: 5 Fingerprint auf DC-Platten von Zebrafischglobulin
(halbschematisch)

Versuchsbedingungen:

Elektrophorese: Puffer: Pyridin-Acetat pH 5,4
500 V 20 mA 1 1/2 h

Chromatographie: Butanol:Pyridin:Eisessig:Wasser
= 3:3:1:3, aufsteigend 7 h

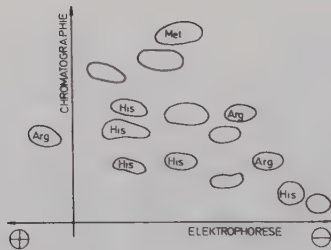


Abb.: 6 Fingerprint auf DC-Platten von Nashornoglobulin- α -Ketten
(halbschematisch)

Versuchsbedingungen:

Elektrophorese: Puffer: Pyridin-Acetat pH 5,4
500 V 20 mA 1 1/2 h

Chromatographie: Butanol:Pyridin:Eisessig:Wasser
= 3:3:3:1:3, aufsteigend 10 h

His, Arg, Met = Peptid enthält Histidin, Arginin, Methionin

Fingerprints

Die Fingerprintmethode ermöglicht auf einfache Art, Unterschiede in den Proteinen durch Vergleich der tryptischen Peptide aufzufinden. Gleichzeitig kann es als Reinheitskriterium angesehen werden, wenn die Anzahl der auf dem Print nachgewiesenen Peptide mit der Summe der Arginine und Lysine des zu untersuchenden Kettenmaterials übereinstimmen.

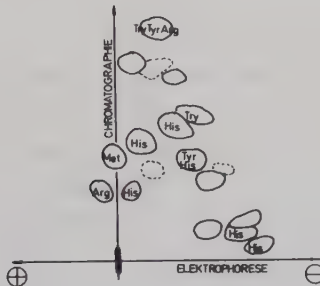


Abb.: 7 Fingerprint auf DC-Platten von Nashornglobin B-Ketten (halbschematisch)

Versuchsbedingungen:

Elektrophorese: Puffer:Pyridin-Acetat pH 5,4
500 V 20 mA 1 1/2 h

Chromatographie: Butanol:Pyridin:Eisessig:Wasser
= 3:3:1:3, aufsteigend 10 h

His,Arg,Met,Tyr,Try= Peptid enthält Histidin, Arginin
Methionin,Tyrosin,Tryptophan.

Lösliche tryptische Peptide

Spaltung

Kettenmaterial wurde nach Hitzedenaturierung bei pH 8 mit TPCK-Trypsin gespalten (29). Das pH wurde durch automatische Zugabe von NaOH konstant gehalten. Die Kinetik der enzymatischen Hydrolyse und der Laugenverbrauch wurden mit einem automatischen Titrator verfolgt. Die Spaltungsdauer betrug 3 h. Bei längeren Spaltungszeiten, ist mit vermehrten unspezifischen Spaltungen zu rechnen. Das Hydrolysat wurde nach der Spaltung eingefroren und anschließend lyophilisiert. Auf eine Ausfällung von isoelektrisch fällbaren Peptiden bei pH 6,4 wurde verzichtet. Stattdessen wurde eine Trennung des "Coreanteils" von den übrigen Peptiden durch Sephadex-Chromatographie versucht.

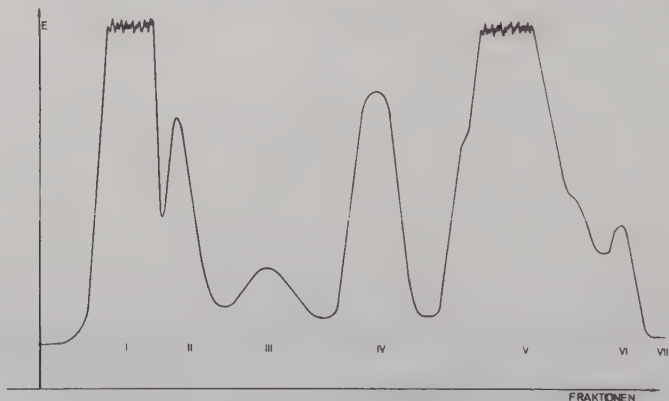


Abb.: 8 Trennung des tryptischen Hydrolysats der λ -Ketten

Versuchsbedingungen:

Säulenmaße: 2,4 x 600 cm

Säulenmatrix: Sephadex G-50 fine

Elutionsmittel: 6 n Essigsäure

Fraktionsgröße: 6 ml

Elutionsgeschwindigkeit: 6,5 ml pro h

Zimmertemperatur

Chromatographie über Gele und Ionenaustauscher

Das lyophilisierte Hydrolysat der α -Ketten wurde über eine Säule mit Sephadex G-50 von 6m Länge vorgetrennt. Die Peptide wurden mit 35% Essigsäure eluiert. (Lauf 6-Rh) Das hatte zwei Vorteile. (Abb. 8) Der ungespaltene Anteil, "Coreanteil" und das 29er Peptid T9, wurden auf diese Weise von den übrigen Peptiden getrennt. Man erhielt salzfreie Präparate, was für die anschließende Ionenaustauschchromatographie sehr von Vorteil war. Von den einzelnen Sephadex-Fractionen IV-VII wurden Fingerprints angefertigt.

Im allgemeinen wurde bei den β -Ketten ebenso verfahren wie bei den α -Ketten. Das lyophilisierte Hydrolysat wurde auf eine 6m lange Säule aufgetragen und in VII Fraktionen eluiert (Abb. 9). Auch in diesem Lauf war es möglich, den "Coreanteil" von den übrigen Peptiden zu trennen. Die Aufarbeitung der Fraktion II erfolgte getrennt (siehe unten). Von den restlichen Fraktionen wurden anhand von Fingerprints, die Peptide in ihrem chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten untersucht. Dabei zeigte sich, daß viele Peptide nicht nur in einem sondern in mehreren Sephadex-Gipfeln vorhanden waren, was die Ausbeute an reinen Peptiden verringerte.

Rechromatographien wurden über Phosphorcellulose, Dowex 50 x 2 und Dowex 1 x 2 durchgeführt. Dabei leistete ein Präparativzusatz zum Beckman-Aminosäure-Analysator (Unichrom) eine große Hilfe. Die Reinheit der rechromatographierten Peptide wurde mit Dünnschichtelektrophorese und Dünnschichtchromatographie (30) geprüft. Für alle, im späteren Teil der Arbeit aufgeführten Peptide, war eine säulenchromatographische Trennung ausreichend. Ein aliquoter Teil wurde mit 6n HCL 20 h bei 108°C im Trockenofen hydrolysiert. Mit einem Aminosäure-Analysator wurde anschließend die Bruttozusammensetzung der Peptide bestimmt.

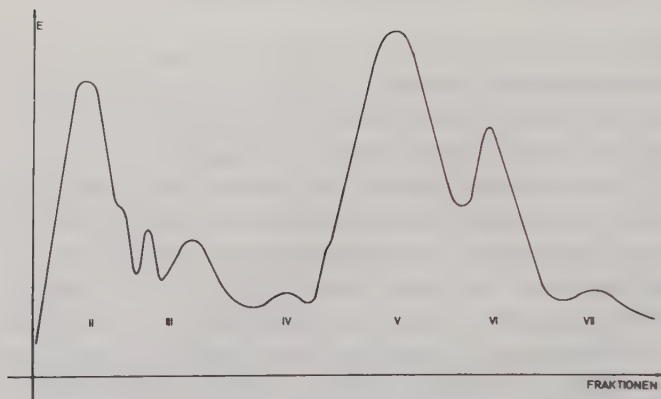


Abb.: 9 Trennung des tryptischen Hydrolysats der β -Ketten

Versuchsbedingungen:

Säulenmaße: 2,4 x 600 cm

Säulenmatrix: Sephadex G-50 fine

Elutionsmittel: 6 n Essigsäure

Fraktionsgröße: 6 ml

Elutionsgeschwindigkeit: 6 ml pro h

Zimmertemperatur

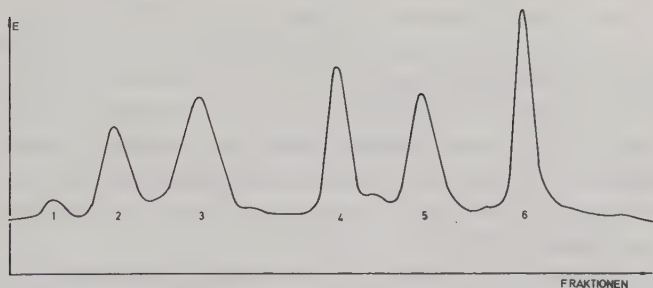


Abb.: 10 Phosphorcelluloselauf der Peptidfraktion V der α -Ketten. Versuchsbedingungen siehe experimenteller Teil.

Aufarbeitung der Fraktion 5-Rh-II

Die Fraktion II aus dem Sephadexlauf der β -Ketten 5-Rh wurde nach Reduktion mit Mercaptoäthanol in 8 molarem Harnstoff mit Äthylenimin umgesetzt, (31) um die SH-Gruppen vor einer Oxydationsreaktion zu schützen. Dabei entsteht S-Aminoäthylcystein (AEC). Diese Aminosäure läuft im Analysator ähnlich wie Lysin. Nach Totalhydrolyse des Umsetzungsproduktes wurde ein Wert von nahezu 1,0 für AEC gefunden. Anschließend wurde die Fraktion nochmals mit Trypsin gespalten und über Aminex Q15 x 8 (sulfonsaurer Kationenaustauscher) in sechs Gipfel aufgetrennt. Die 8% Vernetzung des Harzes wurde gewählt, um bei den hydrophoben Core-Peptiden die Adsorption an die Austauschermatrix herabzusetzen. Aus diesem Lauf wurde auch BT-13 isoliert. Es konnte in den anderen

Sephadex-Fractionen nie in reiner Form isoliert werden. Ebenfalls fand man hier das Tetrapeptid BT-12a. Zwei weitere Chromatographien über Dowex 1 x 2 und über Aminex Q15 x 8 mit einem wesentlich flacheren Gradienten waren nötig, um BT-10 und BT-11 zu isolieren. Beide Peptide haben dieselbe Bruttozusammensetzung, wie die entsprechenden Peptide beim Pferd. Reine Analysen vom letzten stark hydrophoben Core-Peptid BT-12 konnten auch mit dieser Methode nicht erhalten werden. Man findet es hauptsächlich in den Fraktionen 5-Rh-II/4 und 5. Es kann erst mit 6 molarem Pyridin eluiert werden.

Analysen von BT-13 und BT-12a siehe tryptische Peptide der β -Ketten.

Zusammensetzung von:

BT-11

His 1,24, Arg 0,74, Asx 2,08, Glx 0,99, Pro 0,74, Val 1,08
Phe 0,91, Leu 1,16

BT-10

Lys 1,10, His 1,20, AEC 1,00, Asx 1,13, Thr 0,87, Ser 0,93,
Glx 1,23, Gly 0,97

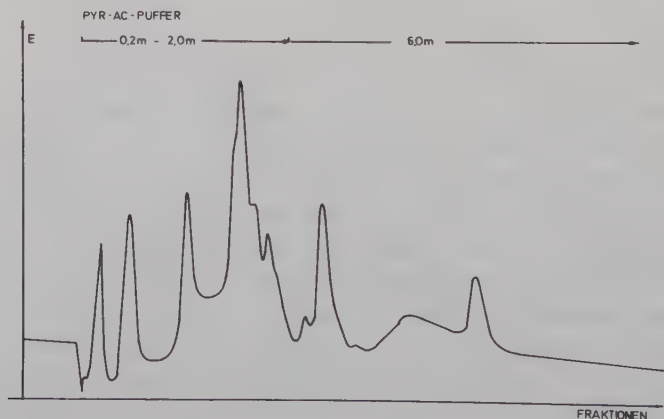


Abb.: 11 Aminex-Lauf der Fraktion 5-Rh-II
Versuchsbedingungen siehe experimenteller Teil
Gradient nach (32)

Bruttoformel tryptischer Peptide (α -Ketten)

α T-(1-2) Lys 1,31, Asx 2,01, Thr 1,94, Ser 1,04,
Pro 0,97, Val 1,96, Leu 1,04

Das Peptid α T-1 konnte nur zusammen mit dem
Peptid α T-2 als ditryptisches Peptid isoliert
werden. Die Reinigung wurde erreicht nach
Chromatographie über Sephadex G-50 und einer
PC-Säule im 4. Gipfel.
(2 Austausche)

α T-2 Lys 1,02, Asx 0,95, Thr 1,06, Val 0,95
Das Peptid erschien im letzten Sephadex G-50
Gipfel mit anderen kleinen Peptiden und
wurde über Phosphorcellulose rechromatographiert.

α T-(3+4) His 0,96, Arg 0,99, Thr 0,96, Glx 4,04,
Gly 3,95, Ala 5,01, Val 1,06, Leu 0,99
Tyr 0,99, Try +
Tryptophan wurde in diesem Peptid nur qualita-
tiv mit Ehrlichs Reagenz nachgewiesen. Der Aus-
tausch Lys-Thr in Pos. α 16 bewirkte, daß hier
keine tryptische Spaltung mehr möglich ist
und infolgedessen die 5 Aminosäuren mit dem
nächstliegenden Argininpeptid wandern.
Das Peptid wurde über Sephadex G-50, Phosphor-
cellulose und Dowex 50 x 2 gereinigt. Position
24 ist nur Tyrosin.
Beim Pferd wird häufig Tyrosin und Phenyl-
alanin gefunden.
(3 Austausche)

- dT-5 Lys 0,98, Thr 1,89, Ser 1,01, Pro 1,05,
Met 0,62, Leu 1,17, Phe 1,87
Reinigung von T-5 über Sephadex G-50 fine
und Phosphorcellulose, Methionin ist bei der
Reinigung des Peptides teilweise zerstört
worden.
(1 Austausch)
- dT-6 Lys 1,01, His 1,95, Asx 1,17, Thr 1,04,
Ser 1,90, Glx 0,95, Pro 0,88, Gly 1,07
Ala 1,10, Val 1,12, Leu 1,09, Tyr 0,88
Phe 1,81
dT-6 wurde über Sephadex G-50 fine im
V. Gipfel und in der Phosphorcellulose im
6. Gipfel gefunden.
- dT-7 Lys 1,01. His 0,99, Gly 1,01, Ala 0,97
- dT-8 Lys
Freies Lysin wurde aus dem letzten Sephadex-
gipfel eluiert und über Phosphorcellulose re-
chromatographiert.
- dT-9 Lys 1,00, His 1,89, Asx 3,94, Thr 1,03,
Ser 2,07, Glx 1,03, Pro 1,07, Gly 3,09,
Ala 4,93, Val 1,97, Leu 6,05, Tyr 0,88
dT-9 konnte aus dem IV. Sephadexgipfel iso-
liert werden, Im gleichen Gipfel wurde das-
selbe Peptid nochmals mit zusätzlichem Lysin
am N-Terminus gefunden.
Beide Peptide wurden über Phosphorcellulose
rechromatographiert.
(3 Austausche)

- α T-10 Arg 0,83, Leu 1,16
α T-10 wurde über Sephadex und PC gereinigt
wie α T-8
- α T-11 Lys 0,97, Asx 2,09, Pro 0,93, Val 1,91
Phe 1,07
α T-11 wurde nach Sephadextrennung aus dem
2. Gipfel der PC-Rechromatographie eluiert.
- α T-(12+13) Die beiden Corepeptide α T-12 und α T-13
konnten ohne peptische oder chymotryptische
Nachspaltung mit den hier verwendeten Chroma-
tographie-Verfahren nicht gereinigt werden.
Auf eine Nachspaltung wurde verzichtet. Man
wollte feststellen, ob ein Verzicht möglich
ist, denn die heutigen chromatographischen
Methoden besitzen ein hohes Auflösungsver-
mögen.
Oxydationsreaktionen an den Cysteinresten
reichten nicht aus, um saubere, integrale
Analysenwerte zu bekommen. Aus der Differenz
zwischen der Summe der Aminosäuren der α-Ket-
ten und der gefundenen Peptide kann man die
Zusammensetzung, mit Vorbehalten errechnen.
Daraus ergibt sich, daß in α T-12 und α T-13
1 Leucin und 1 Glutaminsäure, verglichen mit
α T-12 und α T-13 beim Pferd, fehlen aber
zwei Serin mehr vorhanden sind.

α T-14

Arg 0,98, Tyr 0,51

C-Terminus der α -Ketten. Dieses Peptid läuft
ähnlich wie Position 91-92.

Der geringe Tyrosinwert ist vermutlich, auf
Zerstörung durch 6 n HAC während der Sephadex
G-50 Chromatographie zurückzuführen.

Bruttoformel tryptischer Peptide (β -Ketten)

BT-1 Lys 0,91, Thr 0,96, Glx 3,06, Ala 1,01
 Val 1,01, Leu 1,01

Dieses Peptid erschien nach Sephadex G-50 fine
Vortrennung in dem PC-Lauf in einer dreigipf-
ligen Fraktion, Rechromatographie über Dowex
50 x 2 ergab eine gute Ausbeute.
(2 Austausche)

BT-2 Dies ist das einzige lösliche Peptid, das
 nicht in reiner Form isoliert werden konnte.
 Es lief in kleinen Mengen zusammen mit einer
 Fraktion die BT-3a enthielt.
 Die Mengen reichten nicht für eine weitere Rei-
 nigung aus.

BT-(3a-3b) Lys 0,99, Arg 0,85, Asx 1,05, Glx 3,09,
 Ala 1,13, Val 1,98, Leu 0,99
 Dieses Peptid wurde über Sephadex G-50 in
 2 n HAC vorgetrennt, über Dowex-1 und Dowex
 50 x 2 rechromatographiert. Durch einen
 Asp-Lys Austausch erhält man ein ditryptisches
 Peptid, das bei der tryptischen Hydrolyse nicht
 gespalten wurde.
 Der erste Teil Val-Lys ist identisch mit BT-6
 (2 Austausche)

BT-4 Arg 0,90, Thr 1,07, Glx 1,07, Pro 1,07, Val 1,81
 Leu 2,06, Tyr 0,49, Try +
 Peptid BT-4 wurde nach dem Sephadex G-50 Lauf in
 der Fraktion VI gefunden und über PC und Dowex
 50 x 2 rechromatographiert. Es hat einen Rf-Wert
 größer als Leucin. Tryptophan wurde nur qualitativ
 bestimmt.

- BT-5 Lys 0,88, Asx 3,04, Thr 1,11, Ser 2,13,
Pro 0,77, Gly 2,13, Ala 3,04, Val 1,02
Met 0,99, Leu 1,04, Phe 2,83
BT-5 wurde aus dem β -Ketten Hydrolysat über
Sephadex G-50 getrennt und über PC gereinigt.
(3 Austausche)
- BT-6 Val 1,04, Lys 0,95
BT-6 ist identisch mit BT-5
- BT-7 Lys 1,06, His 0,99, Gly 1,11, Ala 0,82
identisch mit α T-7, Reinigung über Sephadex
G-50 und PC.
- BT-8 Lys
BT-8 wurde ohne Hydrolyse aus der letzten
Sephadex-Fraktion der β -Kette am Analysator
vermessen.
- BT-9 Lys 1,10, His 2,63, Asx 2,83, Ser 1,21, Gly 2,14,
Val 2,15, Leu 2,89, Phe 1,01
Das Peptid wurde über Sephadex- und PC Säulen
gereinigt.
- BT-12a His 0,85, Phe 1,04, Gly 1,09, Lys 0,99
Wurde aus dem II. Sephadexgipfel gewonnen nach
anschließender Umsetzung mit Aziran und Chroma-
tographie über Aminex x 8 -siehe unlösliche
tryptische Peptide der β -Ketten (Fraktion 5-Rh-II)

BT-13 Lys 0,95, Thr 1,09, Glx 3,83, Pro 0,95,
Ala 1,91, Leu 1,13, Tyr 0,87, Phe 1,13
BT-13 wurde wie BT-12a bei der II. Sephadex-
Fraktion gefunden, Reinigung ebenso.
(2 Austausche)

BT-14 Lys 1,09, His 0,90, Asx 0,95, Gly 0,93
 Ala 4,00, Val 2,21, Leu 0,88
 Reinigung erfolgte durch Sephadex G-50 Chroma-
 tographie und PC-Austauscher. Der hohe Val- und
 Ala-Gehalt machten eine 100^h Hydrolyse notwendig.

BT-15 His 1,00, Tyr 0,58
Reinigung des Peptides über Sephadex G-50 und
Dowex 1 x 2.

Tab.: 3 Gegenüberstellung tryptischer Peptide der α -Ketten
von Hauspferd (H) und Nashorn (RH)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Gesamt
	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	
Lys	1	1	1	-	1	1	1	1	1	-	1	1	1	-	10
His	-	-	-	1	-	2	1	-	2	-	-	3	3	-	9
Arg	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1	3
Asp	1	1	1	-	-	1	-	-	5	4	2	3	3	-	12
Thr	-	1	1	-	2	1	-	-	1	-	2	2	2	-	11
Ser	1	1	1	-	1	2	-	-	2	-	-	3	2	-	11
Glu	-	-	-	2	-	1	-	-	1	-	-	1	4	-	7
Pro	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-	1	2	1	-	7
Gly	-	-	-	4	1	1	1	-	3	-	-	-	-	-	9
Ala	2	-	2	3	-	1	1	-	4	2	-	3	-	-	15
Cys	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	1
Val	1	1	-	1	-	1	-	-	2	-	2	2	2	-	12
Met	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Leu	1	-	-	1	1	1	-	-	7	1	-	7	2	-	21
Tyr	-	-	-	1	-	1	-	-	6	-	-	-	-	-	4
Phe	-	-	-	-	2	2	-	-	-	-	1	1	1	-	7
Try	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
S	7	4	5	15	9	16	4	1	29	2	7	28	12	2	141

Tab.: 4 Gegenüberstellung tryptischer Peptide der β -Ketten
von Hauspferd (H) und Nashorn (RH)

-27-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12a	13	14	15	Gesamt
	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	H RH	
Lys	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	-	13
His	-	-	-	-	-	-	1	-	3	1	1	-	1	-	1	1	9
Arg	-	-	1	1	-	-	-	-	3	-	1	-	-	-	-	-	3
Asp	-	1	1	-	4	2	-	-	2	1	2	1	1	-	1	-	13
Thr	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	5
Ser	-	-	-	-	2	-	-	-	1	1	-	-	-	1	-	-	5
Glu	1	-	4	1	-	-	-	-	1	1	1	-	-	2	-	-	13
Pro	-	2	-	1	2	-	-	-	1	1	1	-	-	1	1	-	4
Gly	1	-	3	-	2	-	1	-	2	1	-	1	1	-	1	-	12
Ala	-	1	1	-	1	-	1	-	-	2	-	2	1	1	4	-	17
Cys	-	2	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	1
Val	1	1	2	2	1	1	-	-	2	-	1	2	-	-	3	-	18
Met	-	-	-	2	1	-	-	-	2	-	-	4	-	-	-	-	1
Leu	1	2	1	2	1	-	-	-	3	2	1	4	-	1	1	-	19
Tyr	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1	3
Phe	-	-	-	-	3	-	-	-	1	1	1	-	1	1	-	-	8
Try	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
S	8	9	13	10	19	2	4	1	16	13	9	12	4	12	12	2	146

Auf den folgenden Seiten werden die tryptischen Peptide des Nashornglobins den homologen Sequenzen der langsamen Komponente des Pferdehämoglobins zugeordnet. In α 24 ist beim Pferd neben der Aminosäure Tyrosin auch Phenylalanin vorhanden. Das Nashorn besitzt allein Tyrosin in α 24. α 60 ist Lysin entsprechend der langsamen Kp. des Pferdes. Die gefundenen Austausche wurden nicht durch Sequenzanalyse gesichert. Sie wurden unter Berücksichtigung der Analysenwerte, vieler bekannter Globinsequenzen von Säugetieren und röntgenographischer Daten in die wahrscheinlichste Position gesetzt.

Austausche Pferd-Nashorn

α -Ketten	β -Ketten
T1 Ala-Pro	T1 Ser-Thr
Ala-Thr	Gly-Ala
T3 Ser-Gly	T2 Ala-Ser
Lys-Thr	T3 Asp-Lys
T4 Gly-Glx	Glu-Asx
T5 Gly-Ser	T5 Asx-Thr
T9 Leu-Tyr	Glu-Ala
His-Glx	Pro-Ala
Asx-Ala	T9 Glu-Asx
T12 Ser-Glx	T12 Ala-Val
T13 Ser-Leu	Arg-Lys
	T13 Asp-Glx
	Ser-Ala

Summe 11 Austausche

Summe 13 Austausche

Vergleich der homologen tryptischen Peptide bei
Nashorn- und Pferdeglobin.

α -Ketten

T-1

H	H ₂ N-Val-Leu-Ser-Ala-Ala-Asp-Lys	H=Pferd
RH	H ₂ N-Val-Leu-Ser- <u>Pro-Thr</u> -Asx-Lys	RH=Nashorn

T-2

Thr-Asn-Val-Lys
Thr-Asx-Val-Lys

T-3

Ala-Ala-Try-Ser-Lys
Ala-Ala-Try-Gly-Thr

T-4

Val-Gly-Gly-His-Ala-Gly-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Glu-Arg
Val-Gly-Gly-His-Ala-Glx-Glx-Tyr-Gly-Ala-Glx-Ala-Leu-Glx-Arg

T-5

Met-Phe-Leu-Gly-Phe-Pro-Thr-Lys
Met-Phe-Leu-Ser-Phe-Pro-Thr-Lys

T-6

Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asp-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Glu-Val-Lys
Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-Asx-Leu-Ser-His-Gly-Ser-Ala-Glx-Val-Lys

T-7

Ala-His-Gly-Lys

Ala-His-Gly-Lys

T-8

Lys

Lys

T-9

Val-Ala-Asp-Gly-Leu-Thr-Leu-Ala-Val-Gly-His-Leu-Asp-Asp-
Val-Ala-Ala-Gly-Leu-Thr-Tyr-Ala-Val-Gly-Glx-Leu-Asx-Asx-
-Leu-Pro-Gly-Ala-Phe-Ser-Asp-Leu-Ser-Asn-Leu-His-Ala-His-Lys
-Leu-Pro-Gly-Ala-Phe-Ser-Asx-Leu-Ser-Asx-Leu-His-Ala-His-Lys

T-10

Leu-Arg

Leu-Arg

T-11

Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys

Val-Asx-Pro-Val-Asx-Phe-Lys

T-12

Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Ser-Thr-Leu-Ala-Val-His-Leu-
Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Ser-Thr-Leu-Ala-Val-His-Leu-
-Pro-Asn-Asp-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys
-Pro-Asx-Asx-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Glx-Leu-Asx-Lys

T-13

Phe-Leu-Ser-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys

Phe-Leu-Leu-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys

T-14

Tyr-Arg-COOH

Tyr-Arg-COOH

Vergleich der homologen tryptischen Peptide von
Nashorn- und Pferdeglobin.

β-Ketten

T-1

H	H ₂ N-Val-Gln-Leu-Ser-Gly-Glu-Glu-Lys	H=Pferd
RH	H ₂ N-Val-Glx-Leu- <u>Thr</u> - <u>Ala</u> -Glx-Glx-Lys	RH=Nashorn

T-2

Ala-Ala-Val-Leu-Ala-Leu-Try-Asp-Lys
Ser-Ala-Val-Leu-Ala-Leu-Try-Asx-Lys

T-3

Leu-Leu-Val-Tyr-Pro-Try-Thr-Glu-Arg-
Leu-Leu-Val-Tyr-Pro-Try-Thr-Glu-Arg

T-5

Phe-Phe-Asp-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Asx-Pro-Gly-Ala-Val-
Phe-Phe-Asp-Ser-Phe-Gly-Asx-Leu-Ser-Thr-Pro-Ala-Ala-Val
-Met-Gly-Asp-Pro-Lys
-Met-Gly-Asp-Ala-Lys

T-6

Val-Lys
Val-Lys

T-7

Ala-His-Gly-Lys
Ala-His-Gly-Lys

T-8

Lys

Lys

T-9

Val-Leu-His-Ser-Phe-Gly-Glu-Gly-Val-His-His-Leu-Asp-Asp-Leu-Lys

Val-Leu-His-Ser-Phe-Gly-Asx-Gly-Val-His-His-Leu-Asx-Asx-Leu-Lys

T-10

Gly-Thr-Phe-Ala-Ala-Leu-Ser-Glu-Leu-His-Cys-Asp-Lys

Gly-Thr-Phe-Ala-Ala-Leu-Ser-Glx-Leu-His-Cys-Asx-Lys

T-11

Leu-His-Val-Asx-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg

Leu-His-Val-Asx-Pro-Glu-Asx-Phe-Arg

T-12

Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Ala-Val-Val-Leu-Ala-Arg

Leu-Leu-Gly-Asx-Val-Leu-Val-Val-Val-Leu-Ala-Lys

T-12a

His-Phe-Gly-Lys

His-Phe-Gly-Lys

T-13

Asp-Phe-Thr-Pro-Glu-Leu-Glu-Ala-Ser-Tyr-Glu-Lys

Glx-Phe-Thr-Pro-Glx-Leu-Glx-Ala-Ala-Tyr-Glx-Lys

T-14

Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-Ala-His-Lys

Val-Val-Ala-Gly-Val-Ala-Asx-Ala-Leu-Ala-His-Lys

T-15

Tyr-His-COOH

Tyr-His-COOH

Aminosäureaustausche zwischen Nashorn- und Humanglobin

Austausche Mensch-Nashorn

α - Ketten		β - Ketten	
T1	Ala-Thr	T1	His-Glx
T3	Lys-Thr		Pro-Ala
	Gly-Glx	T2	Thr-Leu
T7	Gly-Ala		Gly-Asx
T9	Asp-Ala	T3	Asn-Lys
	Ala-Gly		Val-Glx
	Asn-Glx	T5	Glu-Asx
	Ala-Gly		Asp-Ala
	His-Tyr		Pro-Ala
	Val-Leu	T9	Gly-His
	Met-Leu		Ala-Ser
	Asn-Gly		Ser-Gly
	Ala-Asx		Leu-Val
T12	Val-Ser		Ala-His
	Ala-Val	T10	Thr-Ala
	Ala-Asx	T11	Phe-Val
	Glu-Asx	T12	Cys-Val
	Ser-Glx		His-Lys
T13	Ala-Leu	T13	Pro-Glx

Summe 19 Austausche

Summe 19 Austausche

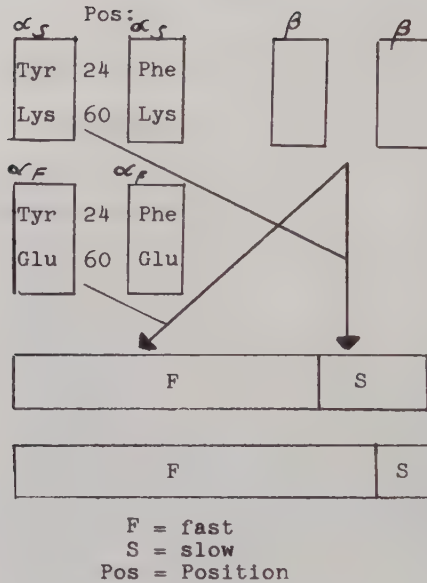


Abb.: 12 Genetische Kontrolle der multiplen Hämoglobine in der Gattung Equus. Es werden keine Erklärungen für quantitative Kontrolle gegeben. (Aus 34 verändert)

Pos. 12-14 der α -Ketten von Pferd-, Esel-, Nashornglobin

	16	20	24
<u>Pferd</u>	Ala-Ala-Try-Ser-Lys-Val-Gly-Gly- <u>His</u> -Ala-Gly-Glu- <u>Tyr</u>		<u>Phe</u>
<u>Esel</u>	Ala-Ala-Try-Ser-Lys-Val-Gly-Gly- <u>Asx</u> -Ala-Gly-Glu- <u>Phe</u>		
<u>Nas-horn</u>	Ala-Ala-Try- <u>Gly</u> - <u>Thr</u> -Val-Gly-Gly-His-Ala- <u>Glx</u> -Glx-Tyr		

D i s k u s s i o n d e r E r g e b n i s s e

Vermutliche Anordnung der Austausche in den tryptischen Peptiden.

Vergleicht man Hämoglobinsequenzen von Tieren, deren phylogenetischer Abstand gering ist, z.B., Vertreter derselben Gattung, Familie und Ordnung, so wird die Arbeit durch das Vorhandensein von homologen Peptidketten und homologen Spaltstellen für Enzyme wie Trypsin und Pepsin erleichtert.

Ausgetauscht sind nur einzelne Aminosäuren und man kann sich zunächst darauf beschränken, festzustellen, wo die Austausche innerhalb der Ketten liegen.

Die große Ähnlichkeit der Aminosäurezusammensetzung von Pferd und Nashornhämoglobin, - 24 von 287 Aminosäuren sind ausgetauscht, - sowie die stattliche Anzahl von bekannten Sequenzen von Säugetierhämoglobinen aus fast allen Ordnungen, lassen eine wahrscheinliche Aussage über die Austausche im Nashornhämoglobin machen. Dabei sind auch die bisher nicht isolierten Peptide eingeschlossen, α T-12, α T-13, β T-2, β T-12. Eine endgültige Aussage ist damit noch nicht gemacht. Die gefundenen Austausche müssen dazu noch sequenzanalytisch bestätigt werden.

α T-4 hat beim Pferd in Position α 24 zwei Aminosäuren. Es sind Tyrosin und Phenylalanin. Beim Nashorn steht in dieser Position nur Tyrosin. Bei dieser Doppeldeutigkeit oder " Ambiguity " handelt es sich nicht um eine verschiedene Ablesung desselben Aminosäurecodewortes auf Translations-ebene, sondern man nimmt an, daß es durch ein ungleiches Crossover des entsprechenden Chromosoms zu einer Duplikation des Gens der α -Ketten gekommen ist.

Die Genduplikation muß sehr spät erfolgt sein, da beim nahverwandten Esel an dieser Position nur Phenylalanin gefunden wurde. (siehe nächste Seite)

Interessant ist der Austausch Lys-- Thr in α 16. In einem abnormalen Hämoglobin (Hb I) steht an dieser Stelle eine Glutaminsäure an Stelle von Lysin (33). Durch diesen Austausch wird diese Hämoglobinvariante zum "schnellen" Hämoglobin, auf einer DEAE-Cellulose säule bei pH 8,6, d.h. daß das Hb I schon mit dem Startpuffer von der Säule eluiert wird. Ein ähnliches Verhalten wurde auch beim Nashornglobin bemerkt. Obwohl hier der Lys-- Thr-Austausch nur den Verlust einer Ladung ausmacht.

Von den Austauschen der β -Ketten ist der Austausch von Asn--Lys in BT-3 auffällig. Diesen Austausch hat das Nashorn gemeinsam mit den widerkäuenden Artiodactylen. Das neuentstandene Val-Lys Peptid kommt in den α -Ketten auch in den Pos. 60-61 vor. Es ist deshalb nur einmal nachzuweisen. Bei BT-5 sind gleich 3 Aminosäuren ausgetauscht. Dieser Bereich der Ketten scheint, stärker als andere, variabel zu sein. In β 116 wurde ein Lysin gefunden. Bei den bisher untersuchten Equiden fand man an dieser Stelle Arginin. Wenn man die Austausche der Aminosäuren der α -und der β -Ketten im Hinblick auf ihren genetischen Code (35) betrachtet, so fällt auf, daß von den 24 geforderten Austauschen, alle, bis auf einen Ser-- Glx-Austausch in α T-12, auf der Veränderung einer Base in der DNS beruhen. Bei den abnormalen Hämoglobinen des Menschen, bisher über 150, wurde in keinem Fall ein Aminosäureaustausch gefunden, der auf einer Mutation zweier Basen beruhte.

Das phylogenetische Alter der Rhinocerotidae

ZUCKERKANDL und PAULING (7) stellten fest, daß, bezogen auf eine Kettenlänge von 100 Aminosäuren, alle 10 Millionen Jahre ein Aminosäureaustausch stattfindet. Bei den Hämoglobinen der Vertebraten mit einer Länge von 141

und 146 Aminosäuren je Kette, errechnet sich dann eine Zeit von 7-8 Millionen Jahren für die Veränderung einer Aminosäure. Diese Zahl muß noch mit dem Faktor 2 versehen werden, da jedes der beiden zu vergleichenden Tiere, eine getrennt voneinander unabhängige Entwicklung durchgemacht hat. Auf das Nashorn angewendet bedeutet das ungefähr 40-45 Millionen Jahre. In jener Zeit, d.h. im Alttertiär, lebte demnach ein Tier, von dem sich auf der einen Seite die Equidae und auf der anderen Seite die Rhinocerotidae entwickelt haben. Der Zeitraum von 45 Millionen Jahren ordnet sich gut in das Bild, das man sich durch paleontologische und morphologische Untersuchungen über die Ordnung der Unpaarhufer macht (36).

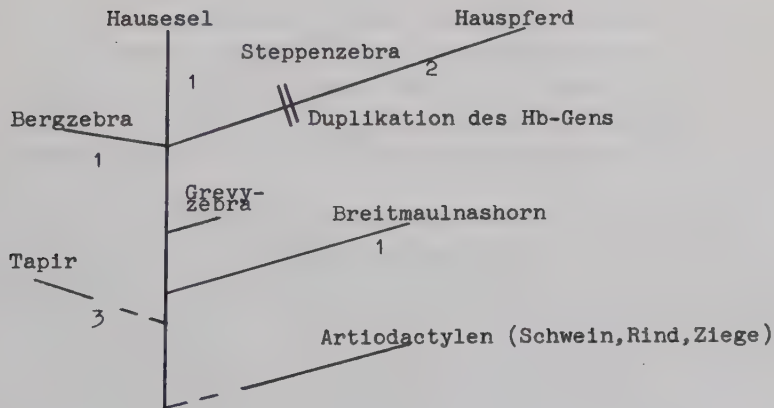


Abb.: 13 Stammbaum der rezenten Perissodactylen, wie er aus der Primärstruktur der Hämoglobine abgeleitet werden kann. (Die Zahlen 1-3 bedeuten die Anzahl der Hb-Komponenten).

Stammbaum der Perissodactylen

In Abb. 13 wird ein Stammbaum von rezenten Perissodactylen gezeigt, der hauptsächlich die Equiden und je einen Vertreter der Nashörner und Tapire berücksichtigt. Es wurden zu diesem Schema auch die Befunde von KITCHEN und EASLEY (34) herangezogen. Sie fanden beim Hb einer anderen Zebraart, wie der hier untersuchten, dem Steppenzebra, unterscheidbare α -Ketten. Bei diesem Hämoglobin sind die α -Ketten in einer nicht näher analysierten Form verändert. Es ist nicht auszuschließen, daß beim Hausesel und beim Bergzebra auch die Duplikation der α -Ketten stattgefunden hat. In diesem Fall würden beide Gene noch identische α -Ketten codieren. Vieles deutet darauf hin, daß auch beim Menschen, zwei nicht allele Gene für die α -Ketten vorhanden sind. So fand LEHMANN (37), daß bei veränderten α -Ketten des Menschen, meist nur 20-30% davon betroffen waren. Dieser Vorgang wird so erklärt, daß eine Mutation im heterozygoten Zustand von zwei Genpaaren jeweils nur das eine betroffen wird. Das Hb des Bergzebras ist dem des Hausesels sehr ähnlich. Bei beiden Tieren ist nur ein Hb nachweisbar.

In α 20 und α 24 sind bei beiden Tieren die gleichen Aminosäuren, Asparagin und Phenylalanin, gefunden worden. (38) Das Bergzebra ist unter allen bisher bekannten Zebraarten dasjenige, das am meisten "asinoid", d.h. eselähnlich ist. Das Hb des Breitmaulnashorns hat in den α - als auch in den β -Ketten 19 Austausche gegenüber dem Hämoglobin des Menschen. Die β -Ketten stehen aufgrund ihrer Austausche denen des Menschen näher als die des Pferdes. (24 Austausche gegenüber den β -Ketten Human Hb-A)

Beim Tapir findet man in der Elektrophorese drei verschiedene Hämoglobinbanden.

Im Vergleich zu den vielen Veränderungen der Hämoglobine

bei den Artiodactylen (39) nimmt sich die Heterogenität des Hb's der Perissodactylen gering aus.

Die Untersuchungen am Hämoglobin der Perissodactylen ergeben eine Grundlage für die ausreichende Bewertung der Aminosäureunterschiede in den α - und β -Ketten des Hämoglobins innerhalb der Stammesgeschichte. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit den hier gesicherten Befunden der zoologischen Systematik zeigt, daß diese Methoden besonders zur Lösung offener Fragen der Systematik der Wirbeltiere geeignet sind. Als Beispiel sei die systematische Stellung der Tubulidentata oder Xenathra (Schuppentier, Gürteltier, Ameisenbär) genannt, die auf diese Weise geklärt werden könnten.

Aus dem Vergleich mehrerer Sequenzen kann die Sequenz des gemeinsamen Vorfahren ermittelt werden. Man kann dadurch die Verzweigungspunkte der Phylogenie viel genauer kennzeichnen, als es mit den meisten Fossilien gelingen kann.

Auf diesem Wege ist es möglich, unabhängig von zusätzlichen Daten, die Evolution auf molekularer Ebene darzustellen. (Abb.: 14 und 15)

Man muß annehmen, daß die gemeinsamen Austausche beim Pferde- und Schweineglobin schon im gemeinsamen Vorfahren auftraten und später, nachdem beide Arten eine getrennte Entwicklung durchgemacht haben, die Aminosäuren ausgetauscht wurden, die zwischen beiden Arten heute unterschiedlich sind.

<u>Schwein</u>	<u>Nashorn</u>	<u>Esel</u>	<u>Pferd</u>
4 Ala	5 Thr	20 His	107 Ser
8 Ala	16 Thr	24 Phe	130 Ser
24 Ala	22 Glx	130 Thr	
35 Gly	64 Ala		4 Ala
53 Asx	72 Tyr		15 Ser
68 Lys	107 Ser		19 Gly
109 Asx	124 Glx		35 Gly
110 Glx	130 Leu		
113 Ala		57 Gly	
118 Ser		65 Gly	
120 Gly		68 Leu	
		82 Asn	
		111 Val	
		71 Gly	
		73 Leu	
		76 Leu	
		78 Glu	
		115 Asp	
		116 Asp	

Abb.: 14 Evolutionsschema des Hämoglobins (α -Ketten)
 Die Austausche der Aminosäuren von Pferde-,
 Esel- und Schweinehämoglobin gegenüber dem
 Humanhämoglobin-A werden verglichen. Die Zahlen
 bedeuten die Positionen in denen der Austausch
 erfolgte. Es wird angenommen, daß identische Aus-
 tausche in gleicher Position schon im ge-
 meinsamen Vorfahren mutierten.

<u>Schwein</u>	<u>Nashorn</u>	<u>Esel</u>	<u>Pferd</u>
4 Ser		52 Ala	
5 Ala		87 Thr	
9 Ala		115 Ser	52 Gly
10 Glx			
13 Gly	5 Ala		
50 Asx	19 Lys		
51 Ala			4 Ser
69 Asx	52 Ala		5 Gly
73 Glx			9 Ala
74 Glx	58 Ala		21 Glx
76 Lys			50 Asp
87 Lys	72 Gly		73 Glx
95 Glx	116 Lys		111 Ala
110 Ile			116 Arg
116 Arg			121 Asx
120 Asx		2 Gln	
121 Asx		16 Asx	
123 Asx		20 Glx	
125 Val		69 His	
130 His		75 Val	
		76 His	
		125 Gln	
		12 Leu	
		43 Asx	
		70 Ser	
		126 Leu	

Abb.: 15 Evolutionsschema des Hämoglobins (ß-Ketten)
 Die Austausche der Aminosäuren von Pferde-, Nashorn-, Esel- und Schweinehämoglobinen gegenüber dem Humanhämoglobin-A werden verglichen. Die Zahlen bedeuten die Positionen, in denen der Austausch erfolgte. Es wird angenommen, daß identische Austausche in gleicher Position schon im gemeinsamen Vorfahren mutierten.

Experimenteller Teil

Gewinnung des Hämoglobins

Das Blut wurde einem weißem Nashorn nach Betäubung mit M 99 entnommen. Das Tier stammte aus dem Umfolozi-Nationalpark in Südafrika . Um die Gerinnung zu verhindern, wurden sterile Blutkonservenflaschen verwendet, die ACD-Stabilisator enthielten. (13,2g Natriumcitrat, 4,4g Citronensäure, 14,7g Traubenzucker mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen). In einer Kühlbox von 6°C Innentemperatur wurden die Konservenflaschen mit dem Auto zum Flugplatz gebracht, Fahrtstrecke: Entnahmeort- Flugplatz, 300 km. Die Gesamttransportzeit: Entnahmeort- München, nur 24 Std. Das Blut wurde 10 Min. lang bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde verworfen, Die Erythrozyten wurden mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) vorsichtig aufgerührt und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Der Waschprozeß wurde dreimal wiederholt, um die Plasmaproteine, soweit als möglich zu entfernen. Anschließend wurden die Erythrozyten hämolysiert. Ein Teil Erythrozytensuspension, ein Teil Aqua dest., ein Teil Toluol (v/v/v) wurden kräftig geschüttelt und 24 Stunden lang im Kühlschrank aufbewahrt. Das Schütteln wurde mehrfach wiederholt. Mit einer Sorvall-Zentrifuge wurde der Zelldebris bei 3°C, 1800 U/Min. und 45 Minuten lang abzentrifugiert. Es bildeten sich, von oben nach unten, eine Toluolschicht, eine kompakte rosa gefärbte Membranschicht und eine tiefrote Hämoglobinlösung. Das Toluol und der Zelldebris wurden verworfen und die Hämoglobinlösung gegen Wasser dialysiert. Es ist dabei zu beachten, daß die Dialysierlösung nicht das pH des IEP des entsprechenden Hämoglobins besitzt, da sonst das Globin ausfällt.

Die Konzentration des Hämoglobins wurde nach BETKE-SAVELSBERG wie in der Met-Cyanform bestimmt:

$$E_{415 \text{ nm}} \times 0,12 \times \text{Verdünnung} = \text{mg/ml}$$

Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurde mit 10% Gel durchgeführt.

Das Gel hatte folgende Zusammensetzung:

Lösung A: pH 8,9 (36,9 Tris, 48 ml 1n HCl, 0,46 ml TEMED
ad 100 ml H₂O

Lösung B: 25g Acrylamid, 0,4g Bis ad 100 ml H₂O

Lösung C: 0,14g (NH₄)₂ S₂ O₈, ad 50 ml H₂O

Das Mischungsverhältnis der Substanzlösungen betrug:

1 Teil A
3,2 Teile B
2 Teile C
und 1,8 Teile H₂O

Der Elektrodenpuffer, pH 8,3, bestand aus 43,2g Glycin
9,0g Tris ad 1000 ml H₂O. Pro Gel-Röhrchen wurden 10_μl
aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke
(4m A pro Röhrchen), Zimmertemperatur und 1,5^h durchge-
führt. Ein Gelröhrchen hatte einen Durchmesser von 0,5 cm
und 8 cm Länge. Nach Beendigung wurden die Gele mit einem
Glycerin-Wassergemisch aus dem Röhrchen gespritzt und an-
schließend 30 Minuten lang mit Amidoschwarzlösung
(0,55g pro 100 ml 7%ige Essigsäure) gefärbt. Die Entfärbung
und die anschließende Aufbewahrung erfolgte in 7%iger
Essigsäure.

Chromatographie der Hb-Lösung

DEAE-Cellulose (Serva, Heidelberg) wurde in Na-Phosphat puffer 0,005 molar pH 8,6 aufgeschwemmt. Nach Absitzen wurde der trübe Überstand abgesaugt. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, bis der Überstand klar war. Die DEAE-Cellulose wurde unter Rühren in eine Chromatographie-Säule (10 x 1cm) eingefüllt. Dann wurde solange äquilibriert bis Startpuffer und Eluat, in Ionenstärke und pH übereinstimmten.

20mg Zebra-Hämoglobin wurden über Nacht gegen den Startpuffer dialysiert, danach auf die Säule aufgetragen und analysiert.

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 8-10 ml/h und 3 ml große Fraktionen wurden gesammelt. Nach 20 Fraktionen wurde der 1. Gradient angelegt. Eine Mischflasche war mit 100ml Startpuffer gefüllt. Dazu wurde aus einem Vorratsgefäß 0,01 m Na-Phosphatpuffer pH 8,6 angesaugt. Nach 120ml wurde der 2. Gradient angelegt. (0,4 m Na-Phosphat). Die eluierten Fraktionen wurden mit einem Photometer (Eppendorf) bei 546 nm vermessen.

Hämabspaltung

Es wurde die Methode von ROSSI-FANELLI verwendet:

300ml salzfrei dialysierte Hämoglobinslösung wurde in 3 Liter peroxydfreies Aceton bei 18°C unter starkem Rühren vorsichtig eingetropft. Das Aceton enthielt 3 ml 2 m HCl/l. Das Globin fiel in dicken Flocken aus.

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Mischung einige Zeit im Kältelabor stehengelassen und später bei -15°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde in verdünnter Essigsäure aufgelöst und gegen 0,1% Essigsäure dialysiert. Die Ausbeute betrug 80%.

Gegenstromverteilung

Als System wurde sek.-Butanol, Dichloressigsäure (DCA) und Essigsäure 0,5 n verwendet. Zunächst wurde der Verteilungskoeffizient bei verschiedenen DCA-Konzentrationen ermittelt. Bei 8% DCA, 0,5 n Essigsäure und sek.-Butanol (1/9/11) (v/v/v) betrug der Koeffizient 1,01.

1800 ml sek.-Butanol, 2200 ml 0,5 n Essigsäure und 200 ml DCA wurden im Scheidetrichter gemischt und 1 Tag lang äquibriert. Danach wurden die Phasen getrennt und die Zwischenphase verworfen.

640 mg Globin wurden in 20 ml Unterphase gelöst und gegen 1 l Unterphase dialysiert. In einem entsprechend großen Meßzylinder wurde zu der Globinlösung dieselbe Menge Oberphase gegeben. Die Phasen wurden gemischt und anschließend getrennt. In 170 Zellen einer automatischen CCD-Apparatur (Fa. Post-Instruments) und einem Fassungsvermögen von 3 ml Unterphase je Zelle wurden äquibrierte Unterphase pipettiert und in das Vorratsgefäß äquibrierte Oberphase gegossen. Auf 9 Mischzellen, Nr. 4-12, wurden je 3 ml globinhaltige Unterphase und 3 ml globinhaltige Oberphase verteilt. Der Versuch wurde mit einer Absitzzeit von 1^h gestartet. Später wurden die Absitzzeiten auf 40, 30, 20 Min. verändert. Nach 170 Transfers wurde der Inhalt der einzelnen Elemente mit einer Glasspritze abgezogen und in Reagenzgläser überführt, die schon 1 ccm Aethanol enthielten. Das Aethanol diente dazu, daß sich die OP und UP vollständig mischten, Anschließend wurde jede Fraktion bei 280 nm vermessen. Die einzelnen Gipfelfraktionen wurden vereinigt und nach Einengen am Rotationsverdampfer gegen verdünnte Essigsäure zweimal dialysiert (nicht länger als 24^h), schließlich wurde das Material lyophilisiert.

Tryptische Spaltung

440 mg Kettenmaterial wurden in 20 ml Wasser gelöst. Mit 1n NaOH wurde das pH auf 8,0 titriert. Das bei pH 6,2 bis 6,4 ausgefallene Kettenmaterial blieb auch bei pH 8,0 ungelöst. Es wurde 5 Min. im siedenden Wasserbad denaturiert, anschließend in Eiswasser gekühlt und in eine auf 38°C thermostatisierte Zelle gegossen. Das pH wurde durch einen Titrator (Radiometer) mit 0,1n NaOH konstant gehalten. Der Verbrauch an NaOH wurde registriert und als Kurve aufgezeichnet.

Als Enzym wurde Trypsin (Serva, Heidelberg) verwendet, das vorher mit TPCK (Tosylaminophenylaethylchloromethylketon) umgesetzt wurde, um chymotryptische Aktivitäten zu hemmen. 5 mg TPCK-Trypsin wurden in 0,5 ml Wasser gelöst und in 2 Portionen zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 3^h. Nach der Spaltung wurde das Hydrolysat lyophilisiert.

Hochspannungselektrophorese

1/10 μ Mol tryptisches Hydrolysat oder sonstiges Peptidgemisch wurden in 100 μ l gelöst und auf Whatman-Papier Nr. 1 (58 x 28 cm) auf eine 2 cm Startlinie aufgetragen.

Das Whatman-Papier wurde mit einem Elektrophoresepuffer pH 5,4 (Pyridin 2 Vol. %: Eisessig 0,8 Vol. %: Wasser 97,2 Vol. %), so gleichmäßig besprüht, daß der Puffer nicht am Papier herabrann.

Der feuchte Bogen wurde in das Gerät eingelegt, die Elektrophorese bei 2,5 KV 50-70 mA 2^h lang durchgeführt.

Anschließend wurde das Chromatogramm luftgetrocknet und mit Ninhydrin besprüht.

Edman- Abbau

Der Edman-Abbau diente zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuren. Es wurde die Streifentechnik nach SCHROEDER (40) angewendet. Die Identifizierung der abgebauten Aminosäuren erfolgte papierchromatographisch.

Oxydation mit Perameisensäure

9,5 ml Ameisensäure und 0,5 ml H_2O_2 (Perhydrol) wurden vermischt und 90 Minuten lang bei Zimmertemperatur reagieren lassen. Danach wurde, die gebildete Perameisensäure auf $-5^{\circ}C$ abgekühlt. In der gekühlten Perameisensäure wurden 2-3 m mol Globin oder Core-Anteil gelöst und 3^h bei $-5^{\circ}C$ belassen. Nach der Reaktion wurde das Gemisch mit Eiswasser auf das 10-fache verdünnt, mehrmals eingeeengt und schließlich lyophilisiert. Auf absolut halogenfreie Ausgangsprodukte ist zu achten.

S-Aminoäthylierung (32)

50 mg Protein wurden in 20 ml Tris-HCl-Puffer gelöst (Puffer: 1 mol Tris HCl pH 8,6 , 8 m Harnstoff, 2 mg/ml EDTA) und unter Stickstoff gehalten. Nach Zugabe von β -Mercaptoäthanol 0,001 ml/ml Lösung, 1^h lang gerührt. Dann 0,02 ml Äthylenimin dazugegeben (C_2H_4N). Die Reaktion wird nach 3^h abgebrochen. Entsalzung über eine Sephadex G-25 Säule mit 1% Ammoniumbicarbonat. Gipfelfraktion wurde lyophilisiert.

Chromatographie über Animex

Animex Q15 x 8 (Fa. Beckman) wurde in eine Säule von 0,9 x 14 cm eingeschlämmt und mit Pyridinacetatpuffer 0,2 m pH 3,1 äquilibriert.

In einer kleinen Mischflasche mit 150 ml Startpuffer wurde ein steiler Gradient erzeugt: 2 m Pyridinacetat pH 5,0. Anschließend wurde direkt 6 m Pyridinacetatpuffer auf die Säule gegeben. Laufgeschwindigkeit 70 ml/h, Fraktionsgröße 5 ml.

Papierchromatographie

Zur Papierchromatographie wurde Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b) verwendet.

Baglioni-System/Butanol: Pyridin : Wasser (35:35:30 v/v/v),

Patridge-System/Butanol: Eisessig: Wasser (4:1:5 v/v/v)
0,1% Ninhydrinlösung, (1g Ninhydrin, 40 ml Collidin, 300 ml Eisessig mit n-Butanol auf 1000 ml auffüllen).

Dünnschichtchromatographie

Celluloseplatten Größe 20 x 20 cm (Fa. Merck), aufsteigende Chromatographie.

System: 10 Teile Eisessig, 30 Teile Pyridin dest.,
30 Teile Wasser, 30 Teile n-Butanol
Laufzeit: 8-9^h

Printtechnik auf DC-Platten

1. Elektrophorese pH 5,4 mit Pyridinacetatpuffer
(40 ml Pyridin und 16 ml Eisessig) 500 V/ 15-20 mA
Elektrophoresekammer (Fa. Camag), 1 1/2-2 h.
2. Chromatographie, wie oben, 8-9 h maximal,
Material: 0,03 - 0,02 μ Mol Substanz, auftragen.

Trennung und Reinigung der Peptide

Die Trennung und Reinigung der Peptidgemische wurde durch Gelfiltration und über Ionenaustauscher erreicht.

Gelfiltration

Sephadex G-50 fine wurde 2 Tage in 35% Essigsäure gequollen und in eine Chromatographiesäule eingeschlämmt. Die Säule bestand aus drei hintereinandergeschalteten 2 m Säulen von 2,4 cm Durchmesser und war mit 35% Essigsäure äquilibriert. 440 mg trypt. Hydrolysat wurden in 7,5 ml Ameisensäure, Wasser und Eisessig aufgelöst, auf die Säule aufgetragen und mit 35%iger Essigsäure eluiert.

Entsalzung

Sephadex G-25 wurde 2 Tage mit 0,5% NH_4HCO_3 -Lösung gequollen, von Feinteilchen befreit und in eine Säule 2,4 x 40 cm eingeschlämmt. Nach Äquilibrierung wurden 50 mg Peptidgemisch (umgesetztes Core mit Aethylenimin)

in 2% NH_3 gelöst und auf die Säule aufgetragen. Die Elution wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug 5 ml/Min. Das Eluat wurde bei 280 nm mit einem Uvicord registriert.

Chromatographie über Anionenaustauscher

Dowex 1 x 2 (200 -400 mesh)

Dowex 1 x 2 wurde mit 2n NaOH 20 Min. behandelt, mit deionisiertem Wasser neutralisiert und mit 50% Essigsäure in die Acetatform überführt und erneut mit Wasser neutralisiert. Das Harz wurde mit Äquilibrierpuffer aufgenommen und bei einer Temperatur von 50°C in eine Chromatographiesäule 1,0 x 150 cm eingefüllt. 150 mg vorfraktionierte β -Ketten wurden in einem Volumen von 10 ml gelöst, auf pH 10 titriert und auf die Säule aufgetragen. Elutionsgeschwindigkeit 70 ml/h.

Der Gradient wurde in einem geschlossenen Mischgefäß erzeugt. Folgende Puffer wurden verwendet:

Äquilibrierpuffer pH 9,4

(1,5% N-Ethylmorpholin, 2% α -Picolin, Eisessig)

1. Gradient pH 8,6 2h

(1,5% 2,4,6 Collidin, 1,5% 2,4 Lutidin, 1,5% α -Picolin, Eisessig)

2. Gradient pH 7,0 6h

(4% α -Picolin, 4% Pyridin, Eisessig)

3. Gradient pH 6,0 6h

(5% α -Picolin, 5% Pyridin, Eisessig)

4. Gradient pH 4,0 6h

(5% α -Picolin, 5% Pyridin, Eisessig)

Chromatographie über Kationenaustauscher

Phosphorcellulose

Die Phosphorcellulose wurde in Wasser gequollen, von Schwebeteilchen befreit, mit dem Startpuffer äquilibriert und in eine Säule 0,9 x 14 cm oder 1,4 x 14 cm eingeschlämmt. Durch ein geschlossenes Mischgefäß wurde ein logarithmischer Stufengradient erzeugt. Der Gradient lag meist zwischen 0,1m Pyridinacetat pH 3,0 und 2m Pyridinacetat pH 5,6. Wenn saure Peptide zu trennen waren, wurde mit 0,05m oder 0,02m Pyridinacetat pH 3,0 begonnen. Cysteinpeptide lassen sich über Phosphorcellulose nicht chromatographieren.

Die Elutionsgeschwindigkeit betrug zwischen 50 und 80ml/h, die Fraktionsgröße 5-8ml, die Säulentemperatur 50-60°C. Das Elutionsprofil wird durch Registrierung des Ninhydrin-farbkompleses aufgezeichnet. Das geschieht in gleicher Weise wie bei der Chromatographie von Aminosäuren auf einem Analysator. Der Unterschied besteht darin, daß im Falle der Aminosäuren die Ninhydrinreaktion mit dem gesamten Eluat durchgeführt wird. Bei der Trennung von Peptiden wird nur 4-8% des Eluats abgezweigt. Die hohe Laufgeschwindigkeit des Pufferstromes (50-80 ml) bewirkt, daß die Pufferpumpe, die die Aliquote für die Farbreaktion entnimmt prozentual kleine Mengen im Vergleich zum Gesamteluat abzweigen kann.

Dowex 50 x 2 (200 - 400 mesh)

Hier wurde entsprechend der Phosphorcellulose verfahren und die gleichen Puffer verwendet.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Hämoglobine von drei Unpaarhufern (Perissodactylen) Zebra, Nashorn und Tapir wurden isoliert und durch ihr Verhalten in der Elektrophorese und Säulenchromatographie charakterisiert. Es wurden beim Tapir drei, beim Nashorn und Zebra je eine Hämoglobinkomponente gefunden.

Die α - und β -Ketten des Nashorn- und Zebraglobins wurden durch Gegenstromverteilung getrennt.

Nach tryptischer Spaltung der α - und β -Ketten des Nashornoglobins konnten die löslichen Peptide isoliert und zugeordnet werden. Die Isolierung des unlöslichen Teils gelang teilweise nach Modifizierung des "Cores".

Die Reihenfolge der Aminosäuren in den tryptischen Peptiden wurde durch Vergleich mit Globinen anderer Säuger ermittelt. Die Ketten des Nashornhämoglobins zeigen große Ähnlichkeit und definierte Unterschiede gegenüber dem Pferdeglobin.

Es wurden mindestens 11 Austausche in den α -Ketten und 13 Austausche in den β -Ketten gefunden.

Auf die phylogenetische Bedeutung der Befunde wird eingegangen, die systematische Stellung des Nashorns auf molekularer Ebene diskutiert und je ein molekularer Stammbaum für die α - und β -Ketten wiedergegeben.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. F. Sanger, E.O.P. Tompson Biochem: J. 53, 353 (1953)
2. A. Kornberg: Science 131, 1503 (1960)
3. J.D. Watson, F.H. Crick, : Nature 171, 737 (1953)
4. E.L. Smith and E. Margoliash, : Fed. Proc. 23, 1243 (1964)
5. M.O. Dayhoff, R.V. Eck, : Atlas of Protein Structure and Sequence 1968 NBRF, Silver Spring, Maryland, USA
6. E.R. Huens et al., : Nature 189, 496 (1961)
- 6a. R.T. Jones, G.L. Capp, D.A. Rigas, : Nature 228, 278 (1970)
7. W.A. Schroeder et al. : Biochem. 2, 992 (1963)
8. E. Zuckerkandl und L. Pauling in Evolving Genes and Proteins (ed. by Bryson and Vogel) p.97 (Academic Press New York 1965)
9. K. Hilse, G. Braunitzer, : Z. Physiol. Chem. 349, 433 (1968)
10. G. Braunitzer, H. Fujiki, : Naturwissenschaften 56, 322 (1969)
11. G. Matsuda, R. Gehring-Müller, G. Braunitzer, : Biochem. Z. 338, 669 (1963)
12. D.B. Smith, : Can. J. Biochem. 42, 755 (1964)
13. D.B. Smith, : Can. J. Biochem. 46, 262 (1968)
14. G. Braunitzer et al., : Z. Physiol. Chem. 331, 1 (1963)
15. G. Braunitzer et al., : Z. Physiol. Chem. 335, 21 (1963)
16. M.F. Perutz, : Nature 194, 914 (1962)
17. R. Cabannes et al., : C.R. Soc. Biol. Paris, 149, 1193 (1955)
18. J.V. Kilmartin et al., : Nature 213, 269 (1967)
19. F. Krug et al., Kongressmit. Int. Biochem. Kongress Madrid (1969)
20. H. Conrad, Diss. Med. Fakultät Univ. München 1971
21. D.L. Drabkin, : J. Biol. Chem. 164, 703 (1946)
22. M.D. Poulík, : Nature, 180, 1477 (1957)
23. H.R. Maurer, Diskelektrophorese Berlin 1968

24. T. H. Huisman, : J. Chrom. 7, 180 (1962)
25. D. A. Spackmann et al., : Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
26. A. Rossi-Fanelli et al., : Arch. Biochem. Biophys. 58, 498 (1955)
27. R. J. Hill, L. C. Craig, : J. Am. Chem. Soc. 81, 2272 (1959)
28. V. Ingram, : Biochem. Biophys. Acta 28, 539 (1958)
29. E. Liebold et al., : Z. Physiol. Chem. 315, 271 (1959)
30. G. Pataki, Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Proteinchemie de Gruyter (1966)
31. M. A. Raftery and R. D. Cole, : Biochem. 10, 467 (1963)
32. D. B. Rifkin, M. Rifkin and W. Konigsberg, : Arch. Biochem. Biophys. 116, 284 (1966)
33. D. Beale, H. Lehmann, : Nature 205, 259 (1965)
34. H. Kitchen, C. Easley, : J. Biol. Chem. 244, 6533 (1969)
35. M. W. Nirenberg, : Proc. Nat. Ac. Sci. (Wash.) 53, 807 (1965)
36. A. S. Romer, : Vertebrate Palaentology 3. Ed. University of Chicago Press 1966
37. H. Lehmann and Carell, : Brit. Med. Bull. 25, 14 (1969)
38. H. Conrad, H.P. Kley, F. Krug, G. Braunitzer Kongressmit.
39. H. Kitchen et al., : J. Biol. Chem. 243, 1204 (1968)
40. O. Antonius, : Die Tigerpferde Verlag Dr. P. Schöps Frankfurt/Main.

Lebenslauf

Am 10. Mai 1941 wurde ich in Hamburg geboren. Meine Eltern sind Dr. med. Gerhard Kley und seine Ehefrau Gisela, geb. von Schwerin.

Nach dem Besuch der Volksschule in Hinterzarten im Hochschwarzwald legte ich 1962 am Keplergymnasium in Freiburg die Reifeprüfung ab. Anschließend absolvierte ich einen zweijährigen Militärdienst.

Das Studium der Biologie begann ich im Sommer 1964 in Freiburg. Sechs Semester später wechselte ich an die Universität München, wo ich mich im Februar 1968 der mündlichen Diplomprüfung unterzog.

Im Juni 1970 heiratete ich Christa Mehnert aus München. Die Experimente für die vorliegende Arbeit wurden im Mai 1968 bis Mai 1971 im Max-Planck-Institut für Biochemie in München durchgeführt.

